

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

11002 U.S. PTO
09/930146



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

#5
7D2C01
R. Teller

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 8月24日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-254500

出 願 人
Applicant(s):

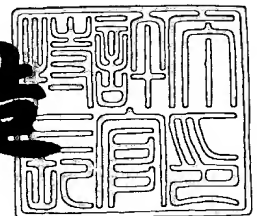
株式会社日立製作所

U. S. Appln. Filed 8-16-01
Inventor: M. Saito et al
Mattingly Stanger & Maler
Docket NIP-236

2001年 1月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3001026

【書類名】 特許願

【整理番号】 J4791

【提出日】 平成12年 8月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 21/64

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地
 株式会社 日立製作所 計測器グループ内

 【氏名】 斎藤 充弘

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 1 2 0 2 番地

 【氏名】 保田 和雄

【特許出願人】

 【識別番号】 000005108

 【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】

 【識別番号】 100074631

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 高田 幸彦

 【電話番号】 0294-24-4406

【選任した代理人】

 【識別番号】 100083389

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 竹ノ内 勝

 【電話番号】 0294-24-4406

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 033123

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光、燐光測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する蛍光、燐光又は光散乱の検出を抑えたことを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項 2】

請求項 1 において、試料保持部の材料がカーボン材、グラシックカーボン、タングステンカーボン又はパイロコートドカーボンの中のいずれかを含み、且つ前記試料保持部の材料が励起光により形成された逆錐形の穴を有し、該穴の底部の面積が $0.01 \sim 5 \text{ mm}^2$ であって、前記穴内に試料が表面張力で保持されていることを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項 3】

請求項 2 において、逆錐形の穴が逆円錐形、逆三角形又は逆四角形であって、該逆錐形の穴の底部から液体試料が漏れることのない表面張力を有し、該表面張力によって試料保持部の穴内に試料が保持されていることを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項 4】

液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光又は光散乱を検出することなく、前記試料保持部の材料を柱状にし、左右又は上下に $0.2 \sim 3 \text{ mm}$ の間隔を置いて保持し、前記試料保持部の穴内に試料が表面張力で保持されていることを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項 5】

透過面蛍光測定方式又は透過面燐光測定方式を用いた蛍光、燐光測定方法において、分析対象試料以外に由来する蛍光又は燐光の検出精度が分析精度に影響を及ぼさない範囲とする試料保持部用いたことを特徴とする蛍光、燐光測定方法。

【請求項 6】

試料を試料保持部に表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させた試料保持部であって、該試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光又は光散乱の検出精度が分析精度に影響を及ぼさない範囲であることを特徴とする試料保持部。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は蛍光測定装置又は燐光測定装置における試料の蛍光、燐光測定方法及びそれに用いる試料保持部（試料ホルダー）に関する。

【0002】

【従来の技術】

蛍光測定装置、燐光測定装置、又は化学発光法を適用した発光測定装置においては、測定時に試料を固定、保持するための試料ホルダーは石英等の透明な鉱石、透明な人工石、あるいはポリカーボネート材、ポリビニル材等が用いられている。

【0003】

これらの試料ホルダーは試料を確実に保持し、一部、ディスプレイに使用でき測定を容易にする。

【0004】

しかし、これらに用いる材料はそれに由来する発光、蛍光、燐光が発生し、試料から発する光と同時に検出されるために測定精度の向上を阻害する。例えば市販の96穴マイクロプレートにおいては、試料を含まない場合でも数穴で光の測定値が著しく高いことがある。このことは、試料中に測定対象物が含まれていないにもかかわらず、あたかも試料中に測定対象物があるかのように分析測定が為される可能性のあることを示している。

【0005】

また、同一材料のセル又はプレートを用いても光の強度にバラツキがあり、適用した分析測定法あるいは測定装置の最小検出限界（分析精度）を著しく低下させる。同様に、全く同一のセルあるいはプレートを繰り返して用いた場合も、こ

の種の光の発光があり、同様の問題が生じる。

【0006】

従来、この試料ホルダー又は容器の材料に由来する光を低減させる目的で、予め蛍光分析等を行い干渉光の小さい材料を選択して用いる、材料を薄くする、材料表面に干渉光を遮蔽するコーティングをする、等の処置を行ってきた。

しかし、いずれの方法も干渉光を十分に低減又は遮蔽すること難しい。

【0007】

試料ホルダーの材料に由来する干渉光の測定への影響を回避する目的で、側面蛍光測定方式又は照射面蛍光測定方式が提案されている。しかし、これらの方式は励起光の光量又は蛍光の光量を多く取り出すために光束の立体角を大きくする必要があり、このため測定装置の作製が難しく、高いコストとなる。また、照射面測光方式では励起光を放射するランプと試料を結ぶ直線の極短い延長線上に試料ホルダーの材料があり、これに由来する干渉光は分析の高精度化を阻害する。

【0008】

蛍光測定装置、燐光測定装置、化学発光法等を適用した発光測定装置及びこれらを適用した自動分析装置を用いて、微量測定対照物が含まれる試料を分析する場合、この干渉光は試料の測定の障害となる。また、干渉光の存在は、本来の装置の能力を低下させ、特に試料中の微量な重要物質の分析検出を妨げる。

【0009】

上記の従来方法は、試料ホルダーの材料として干渉光の放射が小さい材料を単独又は組み合わせる、非特異光を大きくすることになる加工工程を削減する、非特異光を発する物質を混合しない、表面に干渉光の遮蔽処理を行う、ことである。

【0010】

例えば96穴マイクロプレートの試料ホルダーを水平に置き上部に保持材料を使用せず、試料ホルダーの底面と側面のみで試料を保持し、上部からの励起光照射、上部又は底部からの測光に対し、光の通過するホルダー材料面を1面とする手法が用いられている。更に、液体試料を蛍光又は燐光の測光する方式を、透過面測光方式又は側面蛍光方式ではなく、ホルダー材料面を測光が通過することの

ないよう照射面測光を採ることの開示がある。

【0011】

いずれの手法も試料ホルダーは非特異光を発する材料を使用し、ホルダー材料が励起光又は試料の発光の測定光通過方向にあり、充分に干渉光を取り除く機能を備えていない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、液体試料の表面張力を利用し、励起光あるいは試料の発光の測定光通過方向にホルダー材料を置かずに分析測定を可能とする試料保持ホルダーを用いて、試料中の測定対象物の最小検出限界が高感度の蛍光・燐光分析測定方法を提供する。

【0013】

また、試料保持ホルダーにカーボン材等の放射光が小さい材料を用いて作製し、試料の高感度分析測定を行うものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

上記課題を達成する本発明の要旨は以下のとおりである。

【0015】

液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光あるいは光散乱を検出することなく蛍光又は燐光を測定する蛍光、燐光測定方法である。

【0016】

そして、前記の試料保持部の材料がカーボン材、グラシックカーボン、タングステンカーボンまたはパイロコートドカーボンの中のいずれかを含み、且つ前記試料保持部の材料が励起光により形成された逆錐形の穴を有し、該穴の底部の面積が $0.01 \sim 5 \text{ mm}^2$ であって、前記穴内に試料が表面張力で保持されていることが好ましい。更に、前記の逆錐形の穴が逆円錐形、逆三角形又は逆四角形であって、該逆錐形の穴の底部から液体試料が漏れることのない表面張力を有し、該

表面張力によって試料保持部の穴内に試料が保持されていることが好ましい。

【0017】

また、液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光あるいは光散乱を検出することなく、前記試料保持部の材料を柱状にし、左右又は上下に0.2～3mmの間隔を置いて保持し、前記試料保持部の穴内に試料が表面張力で保持されていることを特徴とする蛍光、燐光測定方法である。

【0018】

また、透過面蛍光測定方式又は透過面燐光測定方式を用いた蛍光、燐光測定方法において、分析対象試料以外に由来する非特異的な蛍光又は燐光の検出精度が分析精度に影響を及ぼさない範囲とする試料保持部、

試料を試料保持部に表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させた試料保持部であって、該試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光又は光散乱の検出精度が分析精度に影響を及ぼさない範囲とする試料保持部である。

【0019】

本発明において、蛍光測定装置又は燐光測定装置では試料保持部に試料を固定して分析する。この時、励起光あるいは測定光の方向には試料以外の物を介在させず、試料以外の物に由来する干渉光に影響されることなく、蛍光、燐光を測定する。

【0020】

液体試料はその表面張力により試料保持部（試料ホルダー）に保持され、ランプからの励起光照射を受け試料に由来する蛍光、燐光等の発光を検出、分析される。本発明においては、前記試料ホルダーの材料が試料以外に由来する測定干渉光（蛍光又は燐光）を検出、測定することが極めて小さいことに特徴がある。

【0021】

試料は透過面測光方式、照射面測光方式を用いて分析されるが、励起光光軸、

測定光光軸は試料ホルダー材料の面を通過しない。たとえ試料ホルダーの壁面を励起光が照射しても、試料ホルダーの材料が非蛍光、燐光性であれば問題はなく、散乱光による干渉のみに影響を受ける程度に納まる。散乱光による干渉は時間分解測定で取り除くことができる。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、図1～図4により本発明を詳細に説明する。

【0023】

【実施例1】

図1は蛍光測定装置に用いる試料ホルダーの概略図である。カーボン材プレート1に逆円錐形の穴を上部より開け、底部は極小径の穴を開ける。底部の穴の直径Rは0.5～3mmが好ましい。この円錐形の穴に液体試料2 μ l（マイクロリットル）～200 μ lを滴下し、蛍光測定装置を用いて分析測定する。カーボン材は液を通し難いガラス化炭素又はタングステンカーボン、パイロコートされたものが好ましい。底部の穴の径Rは多量の試料が保持出きるように可能な限り大きくしたほうがよい。Rは液体試料の粘性、試料中微小粒子、凝集塊の有無、界面活性剤の有無等により特定される表面張力により保持される試料の量と関係する。この場合の測定は透過面測光方式又は照射面測光方式を用いる。

【0024】

穴の形状は三角、四角などの逆錐形とすることもでき、底部の穴の面積は0.01～5mm²が好ましい。底部のカーボン材の厚さが薄いほうが望ましいのであるが、脆弱であってはならず、0.3～2mm程度が好ましい。逆錐形上部の円の直径又は三角、四角の面積は底部穴の大きさにもよるのであるが1～100mm²、より好ましくは1～10mmであり、試料台の高さは、2～15mmが好ましい。

【0025】

【実施例2】

図2は蛍光測定装置に用いる別の試料ホルダーの概略図である。

【0026】

カーボン材プレート 1 に上部を大径の円柱、下部を小径の円柱として、試料を多量に保持できる円柱状の穴を開けた例である。直径は 0.5 ~ 3 mm が好ましい。この円柱形の穴に液体試料 5 ~ 200 μ l を滴下し、蛍光測定装置にて分析測定する。この場合の測定は透過面測光方式又は照射面測光方式を用いる。

【0027】

底部の穴の面積は 0.01 ~ 5 mm² が好ましい。底部のカーボン材の厚さが薄いほうが望ましいのであるが、脆弱であってはならず、0.3 ~ 2 mm 程度が好ましい。逆錐形上部の円の直径又は三角、四角の面積は底部穴の大きさにもよるのであるが 1 ~ 100 mm²、より好ましくは 1 ~ 10 mm であり、試料台の高さは、2 ~ 15 mm が好ましい。

【0028】

【実施例 3】

図 3 は蛍光測定装置に用いる他の試料ホルダーの概略図である。

【0029】

カーボン材プレート 1 に円柱状の穴を開ける。この穴が底部に達し穴を貫通させることはない。この穴の大きさは任意であるが、市販の 96 穴マイクロプレートでは上部は 6.5 mm 程度の直径の円形である。底部のカーボン材の厚さが薄いほうが望ましいのであるが、脆弱であってはならず、0.3 ~ 2 mm 程度が好ましい。この場合の測定は照射面測光方式を用いる。

【0030】

【実施例 4】

図 4 に示すごとく、カーボン材円管あるいは角管を 2 本作製し、左右あるいは上下に小さい間隔を置いて保持する。間隙は、0.5 ~ 4 mm 程度が適当である。この間隙に試料 2 ~ 200 μ l を滴下し、測定装置にて分析測定する。角管の試料面での大きさは任意で良いが、0.5 mm³ ~ 100 立方 mm³ が好ましい。

【0031】

次に図 5 及び図 6 を用いて本発明の蛍光、燐光測定方法を詳細に説明する。

【0032】

【実施例 5】

図5に示すごとく、試料3は試料自動分注装置（図中、A.試料の分注（1）に示す）又は人為的にピペットを用いて（図中、A.試料の分注（2）に示す）試料ホルダー穴に分注する。試料3の量は $2 \sim 200 \mu\text{l}$ が好ましく、穴周囲に漏らすことは望ましくない。ホルダー下部（底面）には $0.01 \sim 5 \text{ mm}^2$ 穴があるが、試料3は表面張力にてホルダー4内に保持される（図中、B. 試料容器の測定器への据え付け）。試料3が少量である場合、不均一に穴内にあると測定時の変動が大きくなるため、軽くホルダー4を振動させて、試料3を均一に充填させる。また、試料3が大量にある場合も試料3の表面張力により試料表面が不均一となるから、試料3のホルダー4への分注後、ホルダー4を軽く振とうして表面を滑らかとする。

【0033】

ホルダー4は汚染を受けず無用な干渉光又は散乱光を発生させないためにも、照射光の照射を受ける部位である上面又は下面を直接手で触れずに保持、移動させることが好ましい。ホルダー4底部穴の中心が照射光の中心部に位置することが好ましい。ホルダー台にはガイドを付けホルダーが定められた位置にうまく収まることが好ましく、ホルダー4がずれた位置にある場合、精度の高い計測が行われない場合がある。

【0034】

ホルダーをホルダー台10に置く。装置に入ったホルダー4は測定部照射光にされる部位にセットされ、測定が開始される（図中、C. 計測に示す）。

【0035】

【実施例6】

図6～図9は前記ホルダー4を用いる光学系装置の構成の概略を示した。

【0036】

該光学系装置は透過面測光方式（側面測光方式：図6，図7，照射面測光方式：図8，図9）で測定でき、ホルダー台10の所定位置にホルダー4をセットする。光源6より発せられた励起光は、レンズ7にて集光される。色ガラスフィルター8を通り波長の選択がなされる。光源はキセノンランプ、タングステンランプ、レーザー等を用いる。その後、シャッター9を通過した励起光は試料3に照射

される。このときの照射光の立体角及び光源 6，レンズ 7 から試料 3 までの距離は試料 3 及び試料ホルダー 4 のサイズに合ったものであることが好ましい。

【0037】

試料ホルダー材料への励起光の直接照射は散乱光あるいは余分な干渉光を生むことになる。この為、試料 3 への照射光は平行光として、試料 3 の照射部面積に相当する大きさ又はそれ以下とするか、照射光が試料中あるいは試料の近辺で焦点を結ぶ場合、ホルダー 4 の開口部の大きさと光束の大きさとが同等か光束の大きさが若干小さいことが好ましい。

【0038】

透過面測光方式を用い照射光が平行光でない場合、図 1，図 2 の試料ホルダー 4 においては底部穴の中心を照射光の焦点とすることが好ましい。

【0039】

この場合、図 6 に示すように、光源 6 を下部に、測光器 11 を上部に置き、測光器容器ホルダー 9 及び 10 の下部より照射光を照射し、上部より測光器 11 を用いて測光を行うことは照射光による蛍光，燐光が方向指向性無くす個とができることから、より強い測光検出が為されることもある。同様に、図 3 においては照射面測光方式を採ることができる。

【0040】

これら照射面測光方式をとる場合、図 1，図 2，図 3 のホルダー 4 において試料 3 の底部を焦点とすることが好ましい。この場合、ホルダー 4 の側面にもカーボン材が用いられている場合、励起光，発光ともにカーボン材を横断して進行することはない。

【0041】

本実施例において、より良好に照射及び集光を行うためにダイクロイックフィルター，スプリットミラー，半透過ミラー，平面鏡，凹面鏡，光ファイバーを用いることができる。

【0042】

蛍光又は燐光測定手法においては、蛍光又は燐光の波長は励起光の波長と異なることが好ましく、励起光は試料に適した波長とし、蛍光あるいは燐光の波長に

同じか隣接した波長のものとしなため、あるいは散乱光を遮断するため色ガラスフィルターおよび干渉フィルターを単独あるいは組み合わせて用いることが好ましい。

【0043】

前記のフィルター又はミラーは紫外線によって蛍光を放射し、この光が散乱されて測光器に導入され検知される場合がある。このような光が問題になる場合には干渉フィルターや色ガラスフィルターを蛍光の放射の小さいものを選択すると共に、これらの組み合わせを工夫し試料に由来するものではない蛍光を充分小さく調整する。

【0044】

図1、図2及び図3のホルダー4においてはホルダー側面がカーボン材であれば側面測光方式を採ることはなく、透過面測光方式か、照射面測光方式が用いられる。

【0045】

図4のホルダー4においては、透過面測光方式、照射面測光方式、側面測光方式のいずれも適用される。透過光の焦点は試料の中心又は周辺部、間隙の中心あるいは周辺部のいずれかに設け、試料の効果的な蛍光発光、燐光発光がなされ、かつ、散乱光の極力減少されるようにすることが好ましい。更に試料3中での励起光の屈折率をも考慮されていることが好ましい。

【0046】

上記のいずれの方法においても、試料3に由来する蛍光、燐光を充分効率よく測光するには、光源、レンズ、あるいは試料ホルダー等、試料3に由来するものではない蛍光、燐光の測光を十分に小さく出来るものでなければならない。

【0047】

光源がレーザー光の場合、光束の大きさ又は照射光の中心は試料あるいは測定目的に合ったものとする必要があるが、ランプを用いればより容易に設定できる。

【0048】

測光器11としては光電子倍增管、CCDカメラ、フォトダイオードなどが用

いられる。試料 3 より発せられた蛍光又は燐光を効率よく測光器 1 1 に集光するため、レンズあるいはミラーが用いられる。

【 0 0 4 9 】

また、蛍光又は燐光の波長は励起光の波長と異なることが一般的であることから、励起光あるいは散乱光を遮断し蛍光又は燐光を通過させる色ガラスフィルターおよび干渉フィルターを単独あるいは組み合わせて用いることもある。

【 0 0 5 0 】

測光器 1 1 より得られた計測値は、測光器 1 1 に付属した表示装置の画面に表示されるか、接続したコンピューターに取り込まれ記憶される。

【 0 0 5 1 】

図 7 に透過面測定方式の模式図を示した。図 7 においては、励起光の光路に反射ミラー 1 2 を置き励起光を屈折させた。同様に、測光器側にミラーを置き、蛍光又は燐光を屈折させることもできる。

【 0 0 5 2 】

図 8、図 9 に照射面測光方式の模式図を示した。

【 0 0 5 3 】

図 8 においては、ダイクロイックフィルター 1 3 を置き、励起光は屈折させるが、蛍光又は燐光は通過させた。凹面鏡 1 5 は、蛍光又は燐光の屈折を測光器 1 1 への集光のために用いた。平面鏡あるいはレンズ 7 を用いて、又は光ファイバーで行うこともできる。

【 0 0 5 4 】

図 9 においては、蛍光又は燐光の通過部位にミラーのないスプリットミラー 1 4 を用いて励起光を試料 3 に照射した。蛍光又は燐光の通路に励起光の当たるものを置かず、励起光による干渉光あるいは散乱光の測光器 1 1 への侵入を妨げるか、小さくする為である。蛍光又は燐光をスプリットミラー 1 4 により屈折させ、励起光をスプリットミラー 1 4 の間隙より照射しても良い。

【 0 0 5 5 】

【発明の効果】

本発明は、液体試料の表面張力を利用し、励起光あるいは試料の発光の測定光

通過方向にホルダー材料を置かずに分析測定を可能とする試料保持ホルダーを用いて、試料中の測定対象物の最小検出限界が高感度の蛍光・燐光分析測定方法を提供できる。

【 0 0 5 6 】

また、試料ホルダーにカーボン材等の放射光が小さい材料を用いて作製し、試料の高感度で高効率の分析測定ができる試料ホルダーを提供する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の蛍光測定装置に用いる試料ホルダーの概略図である。

【図 2】 本発明の別の蛍光測定装置に用いる試料ホルダーの概略図である。

【図 3】 本発明の他の蛍光測定装置に用いる試料ホルダーの概略図である。

【図 4】 本発明の透過面測光方式、照射面測光方式、側面測光方式に適用される試料ホルダーの概略図である。

【図 5】 本発明の蛍光、燐光測定方法のプロセスの一例を示す。

【図 6】 透過面測光方式（側面測光）の光学系装置の構成概略図である。

【図 7】 別の透過面測光方式（側面測光）の光学系装置の構成概略図である。

【図 8】 透過面測光方式（照射面測光）の光学系装置の構成概略図である。

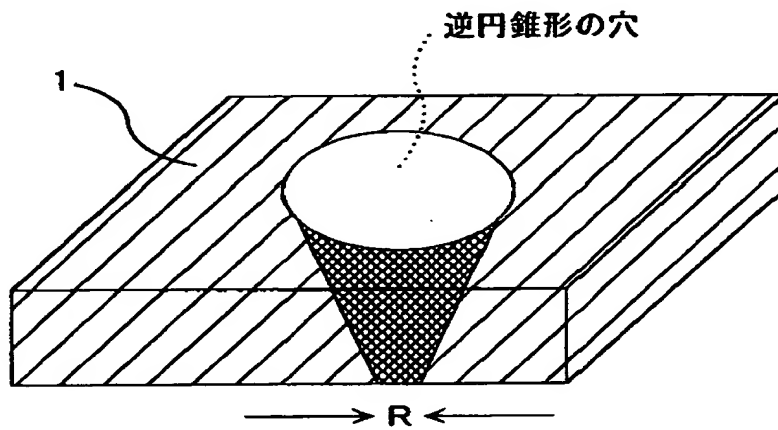
【図 9】 別の透過面測光方式（照射面測光）の光学系装置の構成概略図である。

。

【書類名】 図面

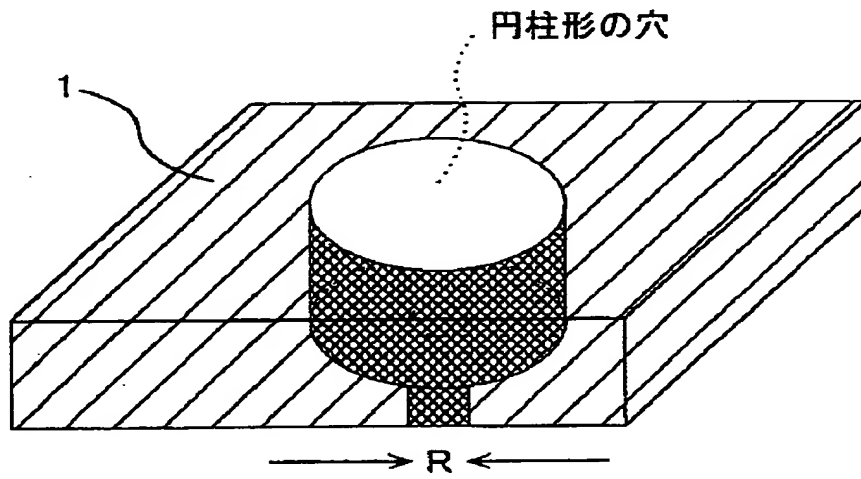
【図 1】

図 1



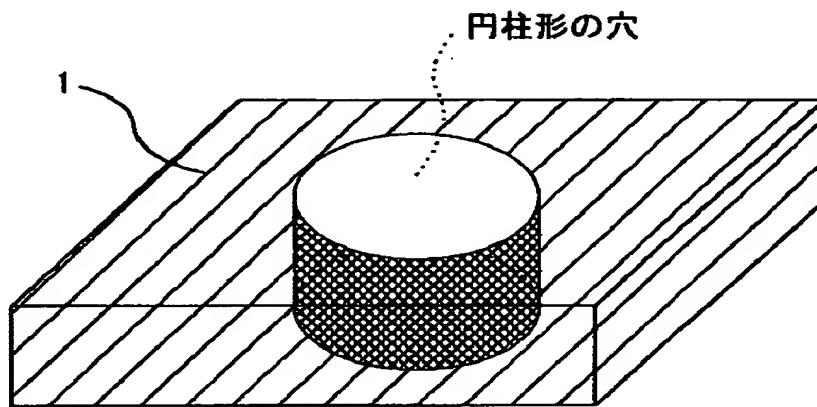
【図 2】

図 2



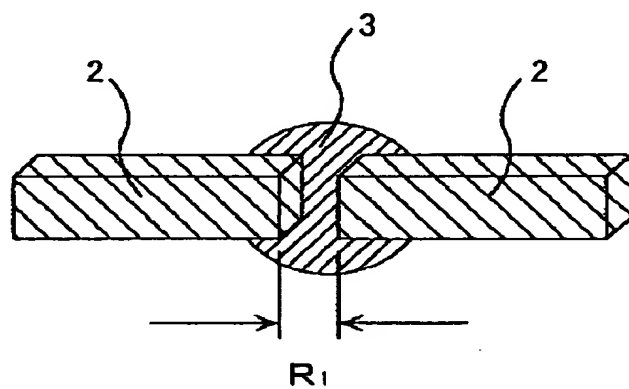
【図 3】

図 3



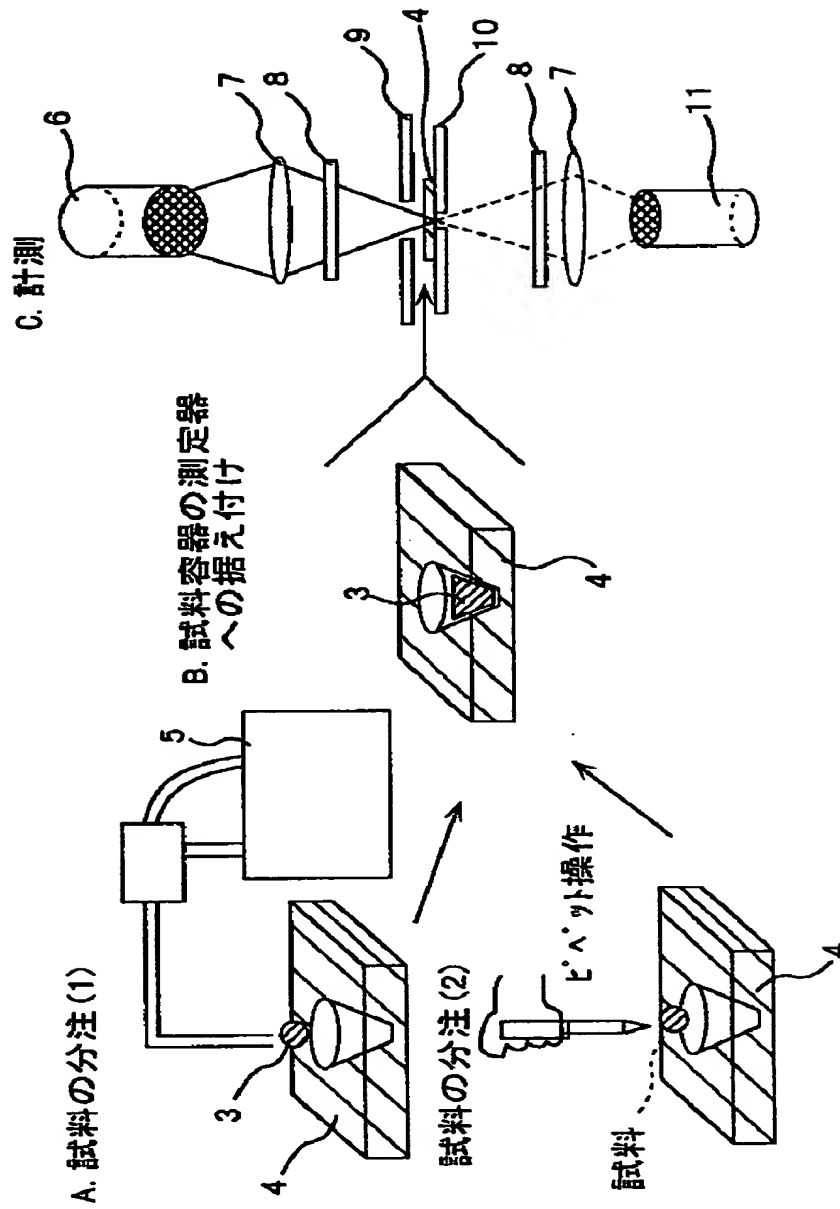
【図 4】

図 4



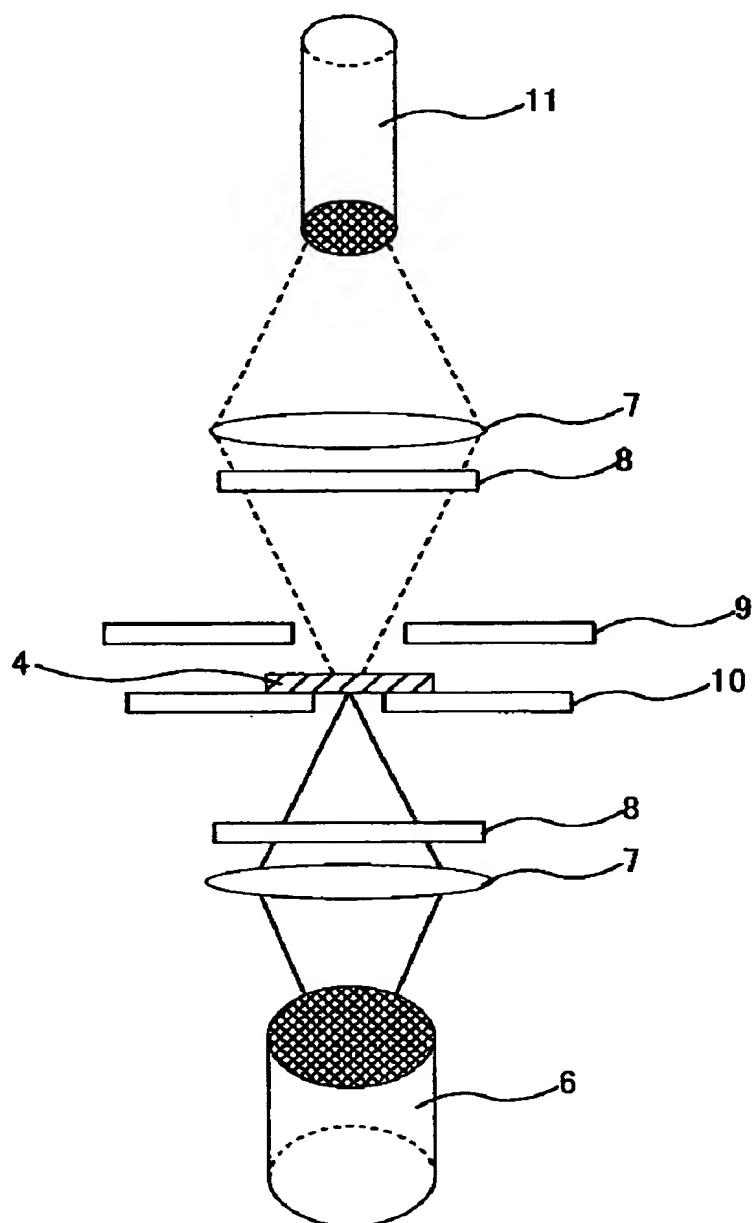
【図 5】

図 5



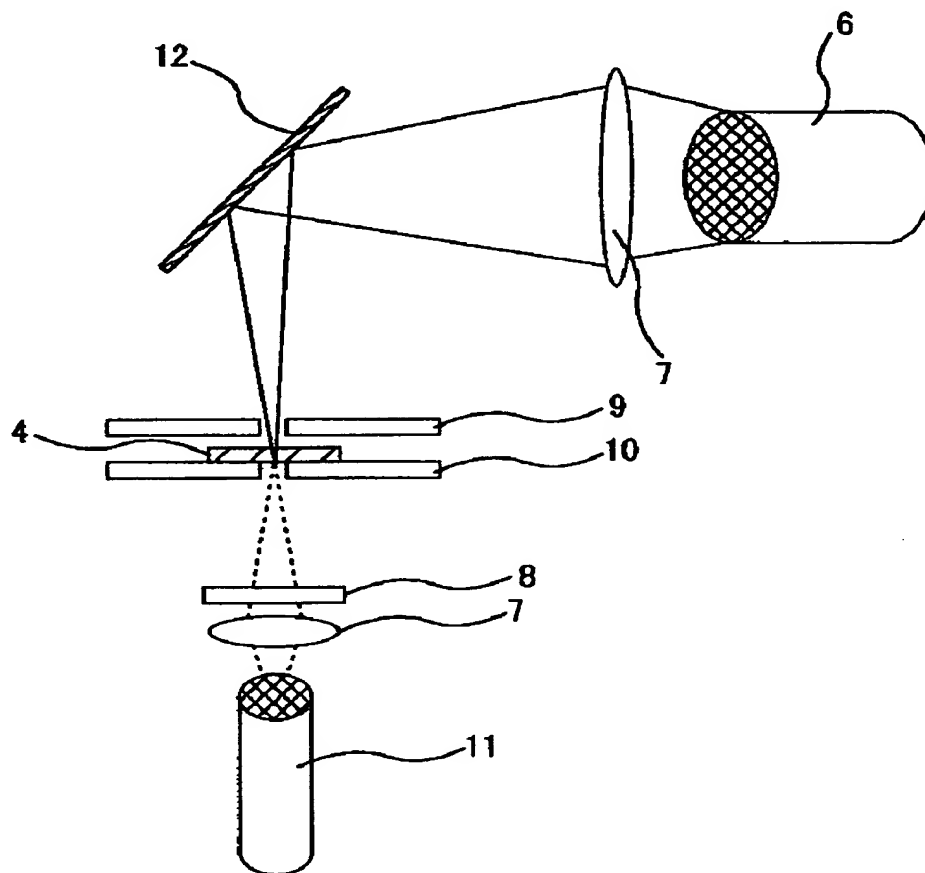
【図6】

図 6



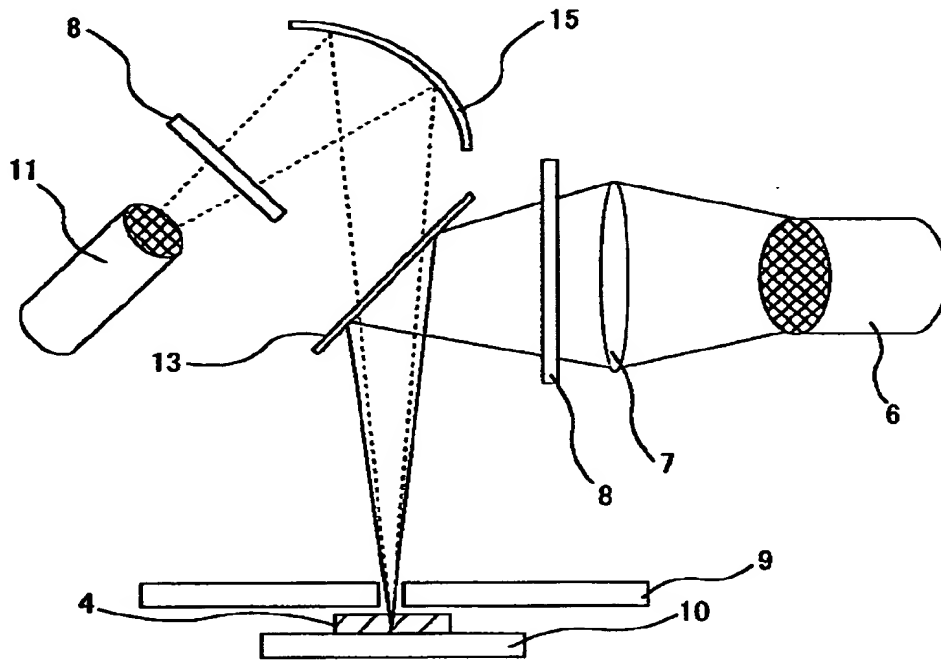
【図 7】

図 7



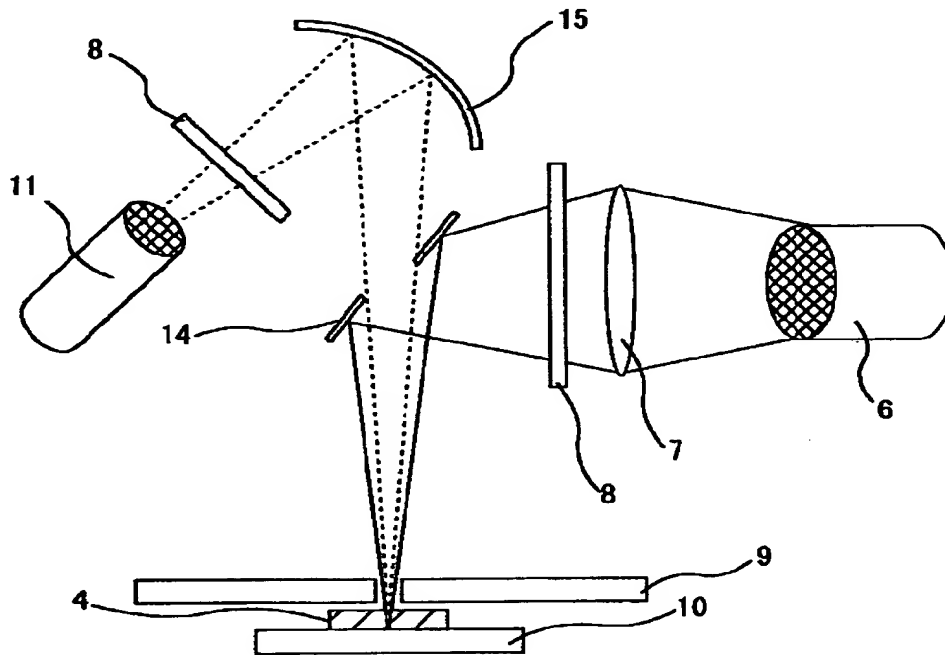
【図 8】

図 8



【図9】

図 9



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、液体試料の表面張力を利用し、励起光あるいは試料の発光の測定光通過方向にホルダー材料を置かずに分析測定を可能とする試料ホルダー及びそれを用いた高感度の蛍光・燐光分析測定方法を提供する。

【解決手段】

液体試料を試料保持部に前記液体試料の表面張力により保持させ、励起光の照射方向に対して前記試料のみを介在させ、前記試料保持部の材料に由来する非特異的な蛍光、燐光あるいは光散乱を検出することなく蛍光又は燐光を測定する蛍光、燐光測定方法及びそれを可能とする試料ホルダー。

【選択図】 図 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日	1990年 8月31日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名	株式会社日立製作所